УДК: 639.9.091

К.В. Гаврилин
«НВЦ Агроветзащита»

УРОВЕНЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Введение

Значительную долю среди патологий рыб занимают бактериальные болезни [1, 2, 3]. Несмотря на большой арсенал химиотерапевтических средств борьба бактериозами рыб представляет значительную проблему. Эта ситуация во многом связана с развитием у возбудителей антибиотикорезистентности. Появление устойчивых штаммов отмечено у широкого круга бактериальных патогенов рыб появились сообщения о появлении лекарственноустойчивых штаммов бактерий в товарном рыбоводстве, аквариумистике, разведении креветок [4, 5, 6]. Устойчивость к антибиотикам формируется у широкого круга бактериальных патогенов рыб: аэромонад, псевдомонад, флавобактерий, миксобактерий и некоторых других [7, 8, 9].

В настоящее время особо остро проблема бактериальных заболеваний рыб стоит в декоративном аквариумном рыбоводстве, при проведении карантина закупленных за рубежом гидробионтов. В связи с чем, целью нашей работы было исследование уровня чувствительности основных групп возбудителей бактериозов рыб к различным антибактериальным химиопрепаратам.

Материалы и методы

Работы провели течение 2006 и 2007 г.г. в аквариальных карантинных цехах г. Москвы и Московской области.

Объектом исследования служили тропические рыбы различных видов спонтанно пораженных бактериальными инфекциями, протекавшими в виде генерализованных септицемий.

Больных рыб подвергали микробиологическим исследованиям. Материал печени и почек засевали на плотные питательные среды МПА (мясопептонный агар) и Эндо. Посевы инкубировали в термостате при 29^0 С, 72 часа. Первичную дифференциацию выделенных культур проводили на среде Олькеницкого. Образование индола учитывали мо методу Синева [10], а наличие цитохромоксидазы по Эрлиху [11]. Отношение к окраске по Граму определяли тестом с 3% КОН.

Идентификацию выделенных бактериальных штаммов проводили при помощи Определителя бактерий Бержи [12] и руководства по изучению энтеробактерий Ф. Кауфмана [13].

Антибиограммы исследовали методом стандартных индикаторных дисков (диффузии в агар) [14] содержащих антибактериальные вещества различных групп: фторхинолонов – ципрофлоксацин; цефалоспоринов – цефтазидим и цефтриаксон; аминогликозидов – гентамицин; тетрациклинов – тетрациклин и левомицетин.

Всего было изучено 214 культур микрроргонизмов.

Результаты и обсуждение

В ходе исследований была выделена нижеследующая доминирующая микрофлора: подвижные представители рода Aeromonas – 22,5% от общего числа изученных культур, семейства Enterobacteriaceae – 22,5%, неферментирующих щелочеобразователей родов Moraxella – 21,4% и Acinetobacter – 19,3%, родов Flavobacterium – 3,1% и Staphilococcus – 4,2%. Большинство этих микроорганизмов описаны в качестве патогенов рыб [15, 16, 17]. Остальные 7% приходилось на грампозитивные сапрофитные микроорганизмы проникшие во внутренние органы рыб видимо за счет критического снижения их иммунофизиологического статуса.

Данные, полученные при изучении антибиограмм выделенных возбудителей представлены в таблицах 1 и 2.

Помимо этого отмечены случаи скоротечного формирования антибиотикорезистентных мутантов in vitro. Аэромонады формировали мутанты резистентные к цефтазидиму в 5% случаев, к цефтриаксону в 5%, к гентамицину 10%. Моракселлы к цефтизидиму в 5%. При исследовании культур ацинетобактеров обнаружено 6,6% мутантов резистентных к цефтазидиму и 4,2% к цефтриаксону. При изучении представителей семейства кишечных бактерий обнаружено 5% культур формировавших устойчивые мутанты к левомицетину.

Из полученных результатов видно, что возбудители бактериальных болезней тро-

Таблица 1

Уровень чувствительности к антибактериальным препаратам доминирующих групп микроорганизмов выделенных от больных рыб в 2006

Группа микроорганизмов	Уровень чувствительности	Антибактериальный препарат					
		Ципро-флоксацин	Цефта-зидим	Цефт-риаксон	Левоми-цетин	Гента-мицин	Тетра-циклин
	Чувствительные	80,0	50,6	62,0	30,5	70,5	0,0
Aeromonas	Промежуточные	10,5	0,0	0,0	9,5	15,0	0,0
	Резистентные	9,5	49,4	38,0	60,0	14,5	100,0
	Чувствительные	85,0	50,0	87,5	50,0	75,0	100,0
Enterobacteriaceae	Промежуточные	5,0	12,5	0,0	24,1	3,4	0,0
	Резистентные	10,0	37,5	12,5	25,9	21,6	0,0
	Чувствительные	72,8	25,0	25,0	0,0		50,0
Moraxella	Промежуточные	13,2	0,0	25,0	0,0	Н/И	50,0
	Резистентные	14,0	75,0	50,0	100,0		0,0
	Чувствительные	86,0	57,1	57,1	80,0	80,0	
Acinetobacter	Промежуточные	14,0	14,2	28,1	0,0	3,6	Н/И
	Резистентные	0,0	28,7	14,4	20,0	19,4	
	Чувствительные	89,1	60,0			79,1	100,0
Flavobacterium	Промежуточные	8,9	24,1	Н/И	Н/И	10,9	0,0
	Резистентные	2,0	15,9			10,0	0,0
	Чувствительные	80,0		70,6			0,0
Staphilococcus	Промежуточные	10,0	Н/И	14,2	Н/И	Н/И	100,0
	Резистентные	10,0		15,2			0,0

Примечание: Н/И – не исследовали.

пических рыб имеют высокий уровень устойчивости к практически всем группам антибактериальных химиопрепаратов. Это скорее всего связано с массированным и не рациональным применением антибиотиков при их выращивании (в рыбоводных хозяйствах Юго-Восточной Азии) и карантинировании.

Наибольшую активность против всех основных групп возбудителей продемонстрировал ципрофлоксацин. Цефтриаксон превосходит ципрофлоксацин по активности против энтеробактерий, но значительно уступает в ему в эффективности по отношению к другим группам возбудителей. Уровень резистентности бактериальных агентов по отношению к традиционно применяемым в рыбоводстве препаратам: левомицетину и тетрациклину, обуславливает их низкую эффективность (что подтверждается терапевтической практикой). Активность против достаточно большого количества штаммов возбудителей продемонстрировал гентамицин, хотя он и несколько уступает ципрофлоксацину.

В ходе работ были так же отмечены случаи формирования резистентных мутантов in vitro. У моракселл к цефтазидиму в 10% изученных культур, энтеробактерий к левомицетину 5% случаев, моракселл к гентамицину 10% случаев.

Исследования 2007 г. подтвердили закономерности выявленные в 2006 г. Наиболее активным антибактериальным агентом является ципрофлоксацин. Цефтриаксон по прежнему превосходит его в активности против отдельных групп возбудителе, значительно уступая в активности против других. Отмечены достаточно существенные колебания активности цефтазидима и гентамицина. На фоне возрастания активности против одних групп возбудителей наблюдается ее падение по отношению к другим группам.

Наличие большого количества случаев скоротечного формирования резистентных мутантов in vitro свидетельствует о высокой способности патогенов рыб формировать лекарственную устойчивость. В этих условиях необходим строгий научный подход к терапии бактериальных заболеваний рыб.

Выводы

В ходе исследований выявлен высокий уровень резистентности бактериальной микрофлоры к антимикробным химиопрепаратам. Это скорее всего связано с массированной не рациональной химиотерапией используемой при выращивании и каран-

Таблица 2

Уровень чувствительности к антибактериальным препаратам доминирующих групп микроорганизмов выделенных от больных рыб в 2007 г.

Группа микроорганизмов	Уровень чувствительности	Антибактериальный препарат					
		Ципрофлоксацин	Цефтазидим	Цефтриаксон	Левомицетин	Гентамицин	Тетрациклин
Aeromonas	Чувствительные	82,0	75,0	75,0	40,0	25,0	0,0
	Промежуточные	12,0	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0
	Резистентные	6,0	25,0	25,0	60,0	25,0	100,0
Enterobacteriaceae	Чувствительные	87,0	75,0	75,0	75,0	75,0	100,0
	Промежуточные	13,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Резистентные	0,0	25,0	25,0	25,0	25,0	0,0
Moraxella	Чувствительные	73,3	42,7	14,4	12,5	28,7	25,0
	Промежуточные	10,6	28,5	57,1	0,0	14,2	25,0
	Резистентные	16,1	14,2	28,5	87,5	57,1	50,0
Acinetobacter	Чувствительные	84,0	10,0	0,0	100,0	0,0	Н/И
	Промежуточные	14,8	80,0	50,0	0,0	100,0	
	Резистентные	3,2	10,0	50,0	0,0	0,0	
Flavobacterium	Чувствительные	89,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Промежуточные	9,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Резистентные	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Staphilococcus	Чувствительные	85,0	60,0	60,0	100,0	100,0	100,0
	Промежуточные	0,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0
	Резистентные	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Примечание: Н/И – не исследовали.

тинировании рыб.

В настоящий момент для импирической терапии бактериозов рыб пригоден только ципрофлоксацин. При этом в течение двух лет не отмечено снижение его активности, что свидетельствет о более медленном (по сравнению с другими препаратами) формировании устойчивости к фторхинолонам. Это согласуется с данными, полученными при его использовании в гуманной медицине [18].

Цефтриаксон и гентамицин активны только против отдельных групп возбудителей, что диктует необходимость проведения микробиологического исследования перед их использованием. Применение «традиционных» для рыбоводства левомицетина и тетрациклина низкоэффективно. Доля устойчивых к их действию штаммов возбудителей достигает 100%.

В данной ситуации необходим научнобоснованный подход к терапии бактериальных болезней рыб, мониторинг уровня антибиотикорезистентности возбуделей и превентивный поиск новых эффективных препаратов.

РЕЗЮМЕ

Исследован уровень чувствительности различных групп микроорганизмов выделенных от больных рыб к антибиотикам. Выявлен высокий уровень чувствительности выделенной микрофлоры к различным классам антибиотиков.

Наиболее активными препаратами из исследованных нами препаратов были ципрофлоксацин, цефтриаксон и гентамицин. Традиционно применяемые, в рыбоводстве антибиотики левомицетин и тетрациклин малоэффективны.

SUMMARY

The level of sensitivity of various groups of microorganisms allocated from sick fishes to antibiotics is investigated. Low level of sensitivity of the allocated micro flora to various classes of antibiotics is revealed.

The most activity monitored: ciprofloxacin, ceftriacson and gentamycin. Traditionally applied, in fish culture antibiotics chloramphenicol and tetracyclin are ineffective.

Литература

1. Гаврилин К.В. Опыт борьбы с бактериальной геморрагической септицемией (БГС) в условиях декоративной аквариумистики // Мат-лы Междунар. научн.-практ. конф. Молодых ученых Киев. 2002. С. 147–149.
2. Dr. Chris Andrews, Adrian Exell & Dr. Neville Carington. The interpet manual of fish health. Interpet Ltd. 2005/ 208 p.
3. Bassleer G. The new illustrated guide to fish diseases in ornamental tropical and pond fish. Westmeerbeec: Responsible publisher. 2005. 232. p.
4. Brown J.H. Antibiotics: Their use and abuse in

aquaculture //World Aquaculture. 1989. P. 34-43.
5. Dixon B.A. Antibiotic resistance of bacterial fish pathogen //World Aquaculture Society. 1994. N 25. P. 60-63.
6. Dixon B.A. The biology of antibiotic resistance // World Aquaculture. 2001. V 32, N 4. P. 63-65.
7. Schlotfeldt H.J., Neumann W., Fuhrmann H., Pfortmueller K., Boehm H. Remarks on increasing resistance of fish pathogenic and facultative-fishpatogenic bacteria in Lower Saxony (FRG) // Fish Pathology. 1985. N 9. P. 85-91.
8. Mc Pherson R.M., De Paola A., Zuwno S.R., Motes J.R., Miles L., Guarino A.M. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds //Aquaculture. 1991. 99, N 3-4. P. 203-211.
9. Lewin C.S., Mechanisms of resistence development in aquatic microorganisms // Chemiotherapy in aquaculture from ther to reality. Paris: O.I.E., 1992. P. 288-301.
10. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С. Современное состояние проблема аэромоноза рыб //Рыбн. хоз.-во / Сер. Аквакультура: Информ. пакет Болезни рыб. М.: ВНИЭРХ, 1997. Вып. 2. С. 1-5.
11. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Бычкова Л.И., Гаврилин К.В. Этиологическая структура аэромонад и эпизоотическая ситуация в рыбоводных хозяйствах // Рыбн. хоз.-во / Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре. Аналит. и реф. информ. М.: ВНИЭРХ. 2001. Вып. 4. С. 1-9.
12. Amlacher E. Taschenbuch der fishkrankheiten. Jena: Gustaf fisher verlag, 1961. 286 s.
13. Bullook G.L., Conroy D.A., Snieszko S.F. Bacterial diseases of fish (eds. Snieszko S.F., Axelord H.R.). Neptune city: T.F.H. Publications, 1972.
14. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания.
15. 9. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Бычкова Л.И., Гаврилин К.В. Этиологическая структура аэромонад и эпизоотическая ситуация в рыбоводных хозяйствах. // Рыбн. хоз.-во / Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре. Аналит. и реф. информ. М.: ВНИЭРХ, 2001; 4: 1–9.
16. Amlacher E. Taschenbuch der fishkrankheiten. Jena: Gustaf fisher verlag, 1961.
17. Bullook G.L., Conroy D.A., Snieszko S.F. Bacterial diseases of fish (eds. Snieszko S.F., Axelord H.R.). Neptune city: T.F.H. Publications, 1972.
18. Падейская Е.Н., Яковлев В.П. Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике. М.: ЛОГАТА, 1998. 352 с.

УДК 619:616.995.1-085

А.А. Зверев
ФГУ «ВГНКИ»

ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ИМИДОКАРБА В ОРГАНИЗМЕ СОБАК

Исследование фармакокинетики имидокарба проводили на 4 беспородных собаках массой 14-17 кг. Перед проведением опыта животные были клинически обследованы, проведены биохимический и общий анализ крови. По результатам исследований патологий выявлено не было.

Препарат животным вводили однократно, внутримышечно в дозе 4 мг/кг. Взятие крови проводили из периферических вен в заранее определенные сроки (15, 30, 45 минут и далее по часам 1; 3; 6; 9; 12; 15; 18; 21; 24; 48; 72; 96 и 120).

Количественное определение содержания имидокарба дипропионата в плазме крови собак проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием.

Принцип метода заключается в экстракции действующего вещества из проб плазмы соляной кислотой с метанолом, переэкстракции в диэтиловый эфир, выщелачивании, упаривание экстракта и хроматографировании на жидкостном хроматографе высокого давления с использованием обращеннофазовой колонки и компьютерной программы обработки данных Мультихром (версия 1.52).

Для определения имидокарба в плазме крови собак использовали: жидкостной хроматограф высокого давления Bischoff с УФ-детектором Lambda 1000; хроматографическая обращеннофазовая колонка Lichrospher 100 RP 18 E (250/4,6 мм) с размером частиц сорбента 5 мкм («Bischoff»); вакуумный ротационный испаритель BŰCHI R-114 с вакуумным насосом BŰCHI B-169 и водяной баней BŰCHI B-480 («Donau»); центрифугу лабораторную Sigma 2 K 15; ультразвуковую ванну DLS-310-T; встряхиватель Techmatic TM 1; весы лабораторные, ГОСТ 24104-2001; посуду мерную, лабораторную стеклянную, ГОСТ 1770; воду деионизированную; кислоту фосфорную, о.с.ч., ТУ 6-09-5480-90 (ООО «Авогадро»); кислоту соляную, 65%, х.ч., ТУ 6-09-2878-84 («Химмед»); диэтиловый эфир, ч.д.а., ТУ 2600-001-43852015-02 («Химмед»); фосфат калия однозамещенный, х.ч. (ООО «Авогадро»); метанол, HPLC Grade («Fisher Chemicals»).

Наиболее оптимальные условия хрома-